

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan di Laboratorium Teknobiologi-Industri, Laboratorium Bioteknologi Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Laboratorium Anatomi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada dan LPPT Unit I UGM untuk pengukuran kadar asam urat. Penelitian ini akan dilaksanakan pada Februari sampai Juni 2016.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain baskom, timbangan analitik, kandang, kipas angin *National*, oven *Venticell MMM Medcenter*, timbangan digital, lumpang porselen, kompor gas Sanken, kain flannel putih, erlenmeyer *Pyrex* 100 dan 1000 ml, gelas ukur *DURAN* (01TX) 500 ml, corong kaca Herma 60 mm, erlenmeyer *Pyrex* 500 ml, *syringe*, *sput* 1 cc, kanul, gelas beker *Schott Duran* 1000 ml, spatula, gelas pengaduk, lemari pendingin LG-MEZ42727703, tabung reaksi Iwaki TB-32, pipet ukur IWAKI, pipet tetes, alu porselen, lumpang porselen, kertas tisu MULTI, termometer batang, lampu spiritus, penjepit kayu, *microtube* 1 cc, nampan plastik, fotometer MICROLAB 300 dan botol kaca *Schott Duran* 1000 ml.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain daun sambiloto dan batang brotowali sebanyak masing-masing 1 kg didapatkan dari Bu Tinem Lantai 1 Pasar Beringharjo, mencit galur *Swiss Webster* umur dua sampai tiga

bulan kelamin jantan berkisar $\pm 20-25$ gram yang diperoleh dari LPPT (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu) UGM unit IV, reagen TBHBA Dyasis, potassium oksonat, sekam, pellet makanan AD II, air, allupurinol, etanol 70%, aquadest, amoniak, kloroform, H_2SO_4 2N, EDTA, pereaksi *Wagner, Mayer, Dragendorff*, etanol, HCl pekat, bubuk Mg, Pb Asetat 10%, asam asetat 10% dan FeCl_3 .

C. Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian experimental, dengan rancangan penelitian *posttest only control group design* yaitu rancangan yang digunakan untuk mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Zainudin, 2000). Rancangan penelitian yang dimaksud yakni Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan kombinasi dekok sambiloto dan brotowali dan 2 Kontrol. Kombinasi dekok sambiloto dan brotowali dengan perbandingan 1:3, 2:2 dan 3:1 akan diujikan pada hewan mencit strain *Swiss Webster*.

Kontrol positif yang digunakan pada percobaan ini adalah Allupurinol dan kontrol negatif yang digunakan adalah aquadest. Terdapat 5 ulangan dengan masing-masing terdiri atas 5 mencit. Pengujian khusus untuk perlakuan dilakukan selama 1 minggu. Perlakuan diterapkan pada hewan uji sudah mengalami hiperurisemia. Rancangan percobaan yang akan dilakukan sesuai dengan Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan Percobaan Kombinasi Dekok Sambiloto dan Brotowali pada Mencit Hiperurisemia

Ulangan	Konsentrasi Dekok Sambiloto: Brotowali (ml/kgBB)			Kontrol + (Na CMC+Allupurinol)	Kontrol – (Aquadess) tanpa perlakuan
	1:3	2:2	3:1		
1	S:B1a	S:B1b	S:B1c	K+1f	K-1g
2	S:B2a	S:B2b	S:B2c	K+2f	K-2g
3	S:B3a	S:B3b	S:B3c	K+3f	K-3g
4	S:B4a	S:B4b	S:B4c	K+4f	K-4g
5	S:B5a	S:B5b	S:B5c	K+5f	K-5g

Keterangan : S = Sambiloto, B = Brotowali, K = Kontrol

Perbandingan 1 = (0,25 ml), 2 = (0,25+0,25 ml = 0,5 ml),

3 = (0,25+0,5 ml = 0,75)

Waktu pencekakan dekok setiap hari

D. Pelaksanaan

1. Pengumpulan dan Pengeringan Bahan baku (Sembiring dkk., 2005 dengan modifikasi)

Bahan baku yaitu daun sambiloto dan batang brotowali diperoleh dari Bu Tinem Pasar Beringharjo. Pengumpulan bahan baku dilakukan dengan mengumpulkan bagian daun untuk sambiloto dan batang tumbuhan brotowali, kemudian dicuci bersih. Setelah itu dikeringanginkan di bawah kipas angin dan kemudian dikeringkan dalam oven selama 8 jam pada suhu 55°C pada batang brotowali dan 40°C pada daun sambiloto.

Perbedaan suhu dalam pengeringan akan terkait dengan kandungan bahan aktif yang terdapat pada tanaman. Setiap jenis tanaman mempunyai respon yang berbeda, ada beberapa tanaman yang peka terhadap penyinaran matahari langsung serta suhu yang terlalu tinggi. Pengeringan yang tepat akan menghasilkan mutu simplisia yang tahan disimpan lama

dan tidak terjadi perubahan bahan aktif yang dikandungnya. Menurut Rusli dan Darmawan (1998) bahwa pengeringan suatu bahan terlalu lama dan suhunya yang terlalu tinggi dapat menurunkan mutu karena dapat merusak komponen-komponen yang terdapat di dalamnya. Oleh karena kandungan batang yang struktur lebih keras sedangkan daun lebih lembut suhu pengovenan berbeda .

2. Persiapan Hewan Percobaan (Tarigan dkk., 2012 dengan modifikasi)

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan galur *Swiss Webster* yang berumur 2-3 bulan, sehat dengan cirri mata bersinar, bulu tidak berdiri dan tingkah laku normal dan berat badan 25-30 g. Hewan uji berjumlah 25 ekor dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor.

3. Aklimatisasi Hewan Percobaan (Haidari dkk., 2009 dengan modifikasi).

Kelima kelompok mencit dikandangkan dengan kondisi kandang yang bersih dan sirkulasi udara yang baik. Aklimatisasi dilakukan selama 1 minggu. Selama aklimatisasi, mencit diberikan pakan *pellet* dan air secara *ad libitum* (secara tidak terbatas) dengan tujuan agar mencit tetap sehat saat diberikan perlakuan. Hewan uji tidak diberi makan 1 jam sebelum penelitian dimulai. Tidak diberi makan supaya penyerapan obat maupun zat pengujian tidak terhambat oleh makanan sehingga efek tidak terganggu, dimana pada perut kosong obat akan bekerja lebih cepat jika dibandingkan perut berisi makanan (Sartono, 2002).

4. Penyiapan Dekok (Hartini, 2011 dengan modifikasi)

Membuat kombinasi dekok herba sambiloto dan batang brotowali dengan dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 g berdasarkan dosis pada uji pendahuluan yang akan dikombinasikan keduanya. Dekok kombinasi diperlukan masing-masing 10 g daun sambiloto dan 10 g batang brotowali kemudian ditambahkan masing-masing 100 ml aquadest, dengan tahapan awal sambiloto dan brotowali yang sudah kering dimasukkan ke dalam masing-masing gelas beker, kemudian ditambahkan aquadest, lalu dipanaskan sesuai dengan suhu optimum metode dekok 90° C yang diukur dengan termometer batang. Setelah mendidih kemudian api dimatikan dan didinginkan sampai suhu 40°C kemudian disaring menggunakan kain kasa untuk mendapatkan filtrat, hasil saringan dimasukkan ke dalam gelas ukur untuk mendapatkan volume yang tepat dan jika filtrat yang dihasilkan kurang dari 100 ml maka ditambahkan aquadest hingga volume larutan tersebut 100 ml.

5. Uji Fitokimia Dekok

a. Uji Alkaloid (Sangi dkk., 2008 dengan modifikasi)

Kombinasi dekok sambiloto:brotowali masing-masing diambil sebanyak 1 ml:3 ml, 2 ml:2 ml dan 3 ml:1 ml selanjutnya ditambahkan 2 ml amoniak dan 2 ml kloroform. Larutan disaring ke dalam tabung reaksi dan filtrat ditambahkan 5 tetes H₂SO₄ 2N. Campuran dikocok dengan teratur, dibiarkan beberapa menit sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas dipindahkan ke dalam tiga tabung reaksi

masing-masing sebanyak 1 ml, kemudian masing-masing tabung tersebut ditambahkan beberapa tetes pereaksi *Mayer*, *Wagner* dan *Dragendorff*. Terbentuk endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid, dengan pereaksi *Mayer* memberikan endapan putih, dengan pereaksi *Wagner* memberikan endapan berwarna coklat dan pereaksi *Dragendorff* memberikan endapan berwarna jingga.

b. Uji Flavonoid (Sangi dkk., 2008 dengan modifikasi)

Kombinasi dekok sambiloto:brotowali masing-masing diambil sebanyak 1 ml:3 ml, 2 ml:2 ml dan 3 ml:1 ml kemudian ditambahkan 2 ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit di dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambah 3 tetes HCL pekat, kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk Mg. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua selama 3 menit.

c. Uji Saponin (Sangi dkk., 2008 dengan modifikasi)

Kombinasi dekok sambiloto:brotowali masing-masing diambil sebanyak 1 ml:3 ml, 2 ml:2 ml dan 3 ml:1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 2 ml dan dididihkan selama 2-3 menit. Setelah itu didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

d. Uji Tanin (Setyowati dkk., 2014 dengan modifikasi)

Untuk Uji Tanin 1 kombinasi dekok sambiloto:brotowali masing-masing diambil sebanyak 1 ml:3 ml, 2 ml:2 ml dan 3ml:1 ml kemudian ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau.

6. Dosis Potassium Oksonat

Dosis potassium oksonat disesuaikan dengan penelitian sebelumnya oleh Yonetani dan Iwaki (1987) dengan 250 mg/kgBB atau 5 mg/20grBB. Potassium oksonat digunakan sebagai penginduksi hiperurisemia karena merupakan inhibitor urikase yang kompetitif untuk meningkatkan kadar asam urat (Astuti, 2011).

7. Pembuatan Larutan Pembanding

Dosis allopurinol yang digunakan adalah 10 mg/kgBB atau 0,2 mg/20 gBB, dimana dosis ini mengacu pada penelitian sebelumnya (Zhao dkk., 2005). Allupurinol lalu digerus dalam lumpang yang telah dikembangkan dengan air panas dan kemudian diencerkan dengan aquadest hingga 10 ml (Muhtadi dkk., 2015).

8. Uji Pendahuluan (Muhtadi dkk., 2014 dengan modifikasi)

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui efek fisiologis dari mencit ketika diinduksikan dan dosis yang tepat untuk mencit. Model pembuatan hiperurisemia dilakukan dengan menimbang 2 ekor mencit dengan berat kira-kira 20-25 gr. Hanya menggunakan 2 ekornya pada dasarnya untuk melihat perbandingan kedua perlakuan dan meminimalisir

kematian hewan uji. Adapun kedua mencit diberi perlakuan sebagai berikut:

- a. Mencit pertama dengan pemberian aquadest sebanyak 0,5 mL/20 g BB secara intraperitoneal.
- b. Mencit hiperurisemia; diberi aquadest sebanyak 0,5 mL/20 g BB, satu jam kemudian diinduksi potassium oksonat 250 mg/kg BB secara intraperitoneal.

9. Uji Perlakuan (Rahman dkk., 2014 dengan modifikasi)

Mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok masing-masing kelompok 5 ekor yang sebelumnya sudah diberikan potassium oksonat secara intraperitoneal selama seminggu. Kelompok perlakuan hewan uji sebagai berikut:

- a. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif yang hanya diberi aquadest.
- b. Kelompok 2: kelompok yang diberi dekok brotowali dan sambiloto 1 : 3 dengan dosis 0,25 : 0,75 ml/20g BB secara intraperitoneal.
- c. Kelompok 3: kelompok yang diberi dekok brotowali dan sambiloto 2 : 2 dengan dosis 0,5 : 0,5 ml/20g BB secara intraperitoneal.
- d. Kelompok 4: kelompok yang diberi dekok brotowali dan sambiloto 3 : 1 dengan dosis 0,75 : 0,25 ml/20g BB secara intraperitoneal.
- e. Kelompok 5: kontrol positif yang diberi allupurinol dengan dosis 10 mg/kg BB secara intraperitoneal.

10. Pengambilan darah (Permatasari, 2012 dengan modifikasi)

Pertama, mencit di-*handling* kemudian ekor mencit dijulurkan dan vena lateralis pada ekor dipotong 0,5 cm dari pangkal ekor dengan gunting yang steril. Setelah itu, darah ditampung pada mikrotube 1 ml yang sebelumnya sudah terisi 0,5 mg EDTA. Fungsi EDTA pada dasarnya sebagai antikoagulan. selanjutnya dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan serum (dilakukan di LPPT UGM Unit 1).

11. Pengukuran Kadar Asam Urat (Ariyanti, dkk., 2007 dengan modifikasi)

Kadar asam urat ditetapkan kadarnya berdasarkan reaksi enzimatis menggunakan reagen *Uric acid* FS*TBHBA.

Tabel 2. Pereaksi Uric Acid FS TBHBA

	Blanko	Standart	Sampel
Aquadest	20 μ L	-	-
Larutan standart	-	20 μ L	-
Serum	-	-	20 μ L
Monoreagen	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L

(Sumber : Ariyanti, dkk., 2007)

Monoreagen dibuat dari pereaksi *Uric acid* FS*TBHBA dengan cara mencampurkan 4 bagian reagen I dengan 1 bagian reagen II. Sampel, standar dan blanko diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, kemudian serum dibaca absorbansinya pada fotometer MICROLAB 300 pada panjang gelombang 546 nm.

E. Analisis Data (Astuti. 2011 dengan modifikasi).

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik. Jika didapatkan data homogen dan terdistribusi normal, dilakukan uji ANAVA satu arah untuk

mengetahui hubungan antara kelompok perlakuan. Bila terdapat pengaruh nyata, maka untuk mengetahui perbedaan antarperlakuan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Analisis data dilakukan dengan program SPSS versi 15.0.

